

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-173458

⑮ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)9月6日

G 01 N 27/46  
27/30

A-7363-2G  
E-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ

⑰ 特 願 昭59-30543

⑱ 出 願 昭59(1984)2月20日

⑲ 発 明 者	河 栗 真 理 子	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	南 海 史 朗	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	飯 島 孝 志	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社	門真市大字門真1006番地	
⑲ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

- (1) 絶縁性の基板上に、少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、この電極系を酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有する反応層および多孔性を有する滷過層で被覆したバイオセンサ。
- (2) 前記滷過層が界面活性剤により処理されている特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (3) 測定極が白金である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (4) 対極が白金又は銀塩化銀である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (5) 反応層および滷過層が親水性の多孔体膜である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (6) 酸化還元酵素及び色素が上記多孔体膜に乾燥状態で保持されている特許請求の範囲第5項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は種々の生体試料中の特定成分を迅速、かつ容易に定量することのできるバイオセンサに関するものである。

従来例の構成とその問題点

近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のバイオセンサが開発され、特に臨床検査分野への応用が試みられている。検査項目及び検体数が増加している現在、迅速に精度よく測定できるバイオセンサが望まれている。

グルコースセンサに例をとると、糖尿病の増加が激しい今日、血液中の血糖値を測定し管理するには、以前のように血液を遠心分離し血漿にして測定するのでは非常に時間がかかるため、全血で測定できるセンサが要求されている。簡易型としては、尿検査の時に使用されている検査紙と同様に、スティック状の支持体に糖(グルコース)にのみ反応する酵素および酵素反応時又は酵素反応の生成物により変化する色素を含有する担体を設

置したものがある。この担体に血液を添加し、一定時間後の色素の変化を目又は光により測定する方式であるが、血液中の色素による妨害が大きく精度は低い。

そこで、第1図のような多層式の分析担体が開発されている。透明な支持体1の上に試薬層2、展開層3、防水層4、濾過層5が順に積層した構造となっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず濾過層5により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層4にある小孔4aから展開層3へ均一に浸透し、試薬層2において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体1を通して矢印の方向から光をあて、分光分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体にくらべ、複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層4が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要があり、装置および担体が複雑化するという問題がある。

#### 発明の構成

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を有し、前記電極系を少なくとも酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有してなる反応層と多孔性を有する濾過層で被覆したことを特徴とする。

本発明のバイオセンサを用いることにより、生体試料の測定を簡易に、精度よく測定することができる。

#### 実施例の説明

本発明のバイオセンサの1つとして、グルコースセンサを例に説明する。第3図にグルコースセンサの一実施例の模式図を示す。塩化ビニル樹脂からなる絶縁性の基板10に白金を埋め込み、測定極11と対極12とする。前記電極系を覆うように、ナイロン不織布13を設置する。このナイロン不織布13は、酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ14と酸化還元酵素と共役する酸化型色素としてフェリシアン化カリウム15を、

溶解含浸後乾燥状態で担持している。このナイロン不織布13の上部に、多孔性(孔径 $1\mu m$ )のポリカーボネートからなる濾過層16を設置する。

最近、酵素反応と電極反応を結びつけて基質濃度を測定するバイオセンサが開発されている。グルコースセンサに例をとると、第2図のように、グルコースオキシダーゼ固定化電極6を容器7に入れ、緩衝液8で満たし、スターラ9で攪拌している中に試料液を添加する。グルコースオキシダーゼ固定化電極6には定電圧が印加されており、試料中のグルコースと反応して生成した過酸化水素を検知して電流が流れグルコース濃度が測定できる。この方式を用いれば、血液中の色素などに妨害されず迅速に測定できる。しかし、攪拌装置が不可欠なためアワが発生したり液の乱れが精度に影響するという問題があった。又希釈しているため、緩衝液の量や試料の添加量に精度が要求され操作が複雑化する不都合があった。

#### 発明の目的

本発明は、上記の問題点を克服し、生体試料中の特定成分を簡易に、迅速かつ精度よく測定できるバイオセンサを得ることを目的とする。

このセンサに血液を添加すると、濾過層により赤血球などの大きな分子が濾過され、ナイロン不織布13からなる反応層において血液中のグルコースがグルコースオキシダーゼ14により酸化される際、フェリシアン化カリウム15が共役して還元されフェロシアン化カリウムが生成する。このフェロシアン化カリウムを、対極12を基準に測定極11の電位を0Vから+0.5Vまで0.1V/秒の速度で掃引することにより酸化する。この時得られる酸化電流は、フェロシアン化カリウムの濃度に比例し、フェロシアン化カリウムは基質濃度に比例して生成するため、酸化電流を測定することにより基質であるグルコースの濃度が検知できる。得られた電流値は、グルコースの標準液で測定したところ、 $800mg/dl$ までグルコースの濃度とよい直線性を示した。酵素と酸化型色素からなる反応層および濾過層は、測定毎に交換し

たが、標準液および血液のサンプル両方において再現性は良好であった。又、血液の添加量を20～140 $\mu$ lの範囲で変化させたが、酸化型色素及び酵素量が充分なため、添加量に関係なく一定の値を示した。

滷過層16として、ポリカーボネートの多孔体を用いることにより、血液中の血球や粘性の物質があらかじめ滷過でき、電極の汚れを少なくすることができた。白金は非常に安定な材料なので電極には最適である。しかし、滷過層がないと、長期間使用しているうちに電極上に血球が付着し、得られる電流値が低下するため、電極をアルコールで洗浄する必要があったが、滷過層により電極を水洗だけで応答が再現性よく保持できるようになった。又、ポリカーボネートの多孔体を界面活性剤として例えばポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル(商品名:トリトンX)の1%溶液中に浸漬後乾燥して使用すると、血液の滷過がすみやかになり、再現性がさらに向上した。血液はかなり粘度があるため、滷過速度が遅いと

いう問題点があったが、界面活性剤で処理した滷過層を用いることにより、滷過がすみやかになり、すばやく均一に酵素および色素と反応でき、サンプル添加後1分程度という短時間に反応が完結した。界面活性剤を使用しない場合は、反応が完結するまでに血液添加後1分30秒程度必要とするので、測定迅速化に大きな効果があった。

測定極および対極に白金を用いて2電極系で測定する場合は、対極の面積を測定極のそれより十分大きくした方が、対極の分極が少なくなり、良好な応答が得られた。又、対極を銀塩化銀にすると、電位は安定し、対極の面積も小さくできるため小型化が可能になった。

第4図のように、塩化ビニル樹脂の基板10にそれぞれ白金を埋め込み、測定極11, 対極12および参照極17からなる3電極で電極系を構成した。参照極を用いた3電極とすることにより、電位が安定して、応答再現性が向上した。また、上記に述べた様に対極面積を大きくする必要もなくなり小型化できた。電極系を形成するには上記

のように白金を樹脂に埋めこんでもよいが、基板上に蒸着法あるいはスパッタ法により白金層を形成して電極系を構成することもできる。

酸化型色素及び酵素よりなる反応層は、試料液をすみやかに吸収し酵素反応をおこなわせることができるように、親水性の多孔体膜であることが望ましい。たとえば、ろ紙やバルブの不織布、セラミックの多孔体、ガラスの多孔体などを用いると、試料液が均一にすばやく浸透し再現性も良好であった。さらに、ナイロン不織布において、前記の界面活性剤で処理したものは、処理しなかったものより試料液の浸透がすみやかであり、測定の迅速化に効果があった。

酵素と酸化型色素を細かく粉碎混合後、加圧した成形体を反応層とすると、血液の液体成分により酵素および酸化型色素がすみやかに溶け均一に混合するため、反応の迅速化に大きく貢献した。また、酸化型色素と酵素を加圧成形する際、結着剤として、 $\text{SiO}_2$ などを少量混合すると、成形体の強度が増すので取り扱いが簡易となる。結着剤

としては、酵素反応及び電極反応に無関係で親水性のものが適している。

酸化型色素および酵素は、なるべく血液の液体成分に速く溶ける状態におくことが望ましい。そこで、酸化型色素の水溶液をナイロン不織布に含浸後、熱風乾燥すると、真空乾燥したものより非常に細かい結晶となり、液体にとけやすくなった。又、酸化型色素の水溶液を浸漬したナイロン不織布を、エタノールのような水に対する溶解度の大きい有機溶媒中に浸漬後真空乾燥すると、さらに細かい結晶を担持することができた。酵素は熱などに弱いので、含浸後真空乾燥を行なった。

そこで、第5図の構成からなるセンサを試みた。電極系は第4図と同様で、その上にポリカーボネート多孔体膜からなる滷過層16、次にグルコースオキシダーゼ14を担持したナイロン不織布18、その上部にフェリシアン化カリウム15を含浸後エタノールに浸漬し乾燥して担持したナイロン不織布19を設置する。なお、ポリカーボネート多孔体膜およびナイロン不織布は、あらかじめ

め前記の界面活性剤で処理した。

このセンサに血液を添加すると、すみやかにナイロン不織布の層に浸透し、フェリシアン化カリウム15とグルコースオキシダーゼ14が溶解して反応が進みながら、血液の液体成分のみが濾過層16を通過し電極系に至る。フェリシアン化カリウムを細かい結晶状態で担持してあるので、すみやかに溶解し酵素と共役して反応でき、反応時間が約1分間以内と短縮できた。濾過層は、第5図のように電極上においても、反応層の上部においてもよい。又、色素担持層19と酵素担持層18ではさんでもよい。液の浸透は、濾過層が反応層の下に設置した時が一番早く反応時間が短かった。しかし、反応層の上部に濾過層を設置すると、先に血液中の固体成分が濾過できるので、反応層において血球などによる妨害がないため、スムーズに反応が進むという利点があり、高精度であった。濾過層としては、不織布、化学繊維、紙(濾紙)、ガラスの多孔体などが考えられるが、血球の有形成分を濾別するには約2~3 $\mu$ m以下の孔

径を有するメンブランフィルターが必要となる。そこで、メンブランフィルター層又は、それに前記の不織布、化学繊維、紙などを積層してもよい。

界面活性剤としては、前記の例の他に、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステルなども使用できる。界面活性剤により、濾過層だけでなく色素及び酵素も処理しておくことにより、濾過および浸透速度がますます速くなり、反応も速くできる。

色素としては、上記に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので適しているが、P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノール、インドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 $\beta$ -ナフトキノン4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

なお、上記実施例におけるセンサはグルコースに限らず、アルコールセンサやコレステロールセ

ンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。又、酵素は固定化した状態で担持することにより長期保存においても安定に活性を維持することができる。

#### 発明の効果

本発明のセンサによれば、直接試料液を含浸させて微量の特定成分を簡易に、しかも迅速に精度よく測定することができる。また、濾過層により、電極を長期間安定に保持できる。さらに、界面活性剤により浸透が速くなり反応時間が短縮できる。

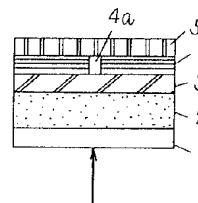
#### 4、図面の簡単な説明

第1図及び第2図は従来のグルコースセンサの構成を示す略図、第3図、第4図及び第5図は本発明の実施例であるグルコースセンサの模式図である。

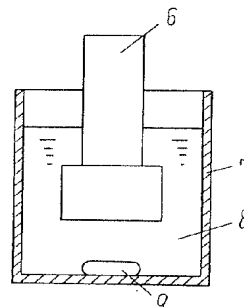
10……基板、11……測定極、12……対極、13……多孔体(反応層)、14……酵素、15……色素、16……濾過層、17……参照極。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

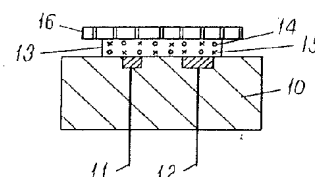
第 1 図



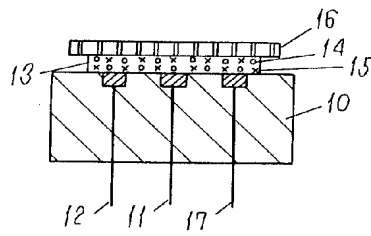
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

